



**DB-1250**

**RT-PCR Respiratory panel 1:**

**SARS-CoV-2/Flu/RSV**

## **Návod k použití**

Verze návodu: DB-1250-006-230918

Revize: 1.3 CZ

Poslední aktualizace: 22.09.2023



**REF** DB-1250-100rxns obsahuje reagentie pro 100 reakcí

**REF** DB-1250-1000rxns obsahuje reagentie pro 1000 reakcí

## Obsah

1	Úvod .....	3
1.1	Použití (určený účel soupravy) .....	3
1.2	Souhrn a vysvětlení testu .....	3
1.3	Princip fungování testu .....	3
1.4	Vhodné vzorky a kompatibilní odběrové sady .....	4
1.5	Kompatibilní automatizace a PCR přístroje .....	4
2	Charakteristiky testu.....	5
2.1	Analytická reaktivita (inkluzivita) .....	5
2.2	Limit detekce (LOD).....	6
2.3	Intraassay a Interassay variabilita .....	7
2.4	Testování kompetitivní interference (detekce koinfekcí).....	8
2.5	Klinická výkonnost, souhrnné výsledky .....	9
3	Bezpečnostní upozornění .....	12
4	Seznam materiálů.....	13
4.1	Požadované laboratorní vybavení .....	13
4.2	Doporučené laboratorní vybavení.....	13
4.3	Požadovaný materiál, který není součástí soupravy.....	13
4.4	Materiál, který je součástí soupravy .....	13
4.5	Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu .....	14
5	Návod k použití.....	15
5.1	Obecné postupy .....	15
5.2	Jak zamezit kontaminacím (falešně pozitivním výsledkům) .....	15
5.3	Požadované kontroly v každém stanovení .....	15
5.4	Než začnete.....	16
5.5	Přidání kontroly izolace RNA (Isolation control).....	16
5.6	Příprava RT-PCR master mixu.....	16
5.7	Přidání vzorku do RT-PCR reakce.....	18
5.8	Protokol RT-PCR .....	18
5.8.1	Nastavení přístrojů BioRad CFX96™ a BioRad CFX Opus 96.....	18
5.9	Analýza dat.....	19
5.9.1	Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu (Ct).....	19
5.9.2	Vyhodnocení kontrol.....	20
5.9.3	Interpretace výsledků měřených vzorků .....	20
5.9.4	Typické výsledky .....	23
6	Právní upozornění .....	24
7	Seznam kompatibilních prostředků .....	24
8	Jednostránkový souhrnný protokol .....	25
8.1	Složky soupravy.....	25
8.2	Příprava RT-PCR .....	25
8.3	Protokol RT-PCR .....	25
9	Použité grafické symboly .....	26



# 1 Úvod

## 1.1 Použití (určený účel soupravy)

RT-PCR Respiratory panel 1: SARS-CoV-2/Flu/RSV je určen pro současnou detekci a diferenciaci nukleových kyselin virů SARS-CoV-2, chřipky A (Influenza A, IAV), chřipky B (Influenza B, IBV) a respiračního syncytiálního viru (RSV) pomocí jednokrokového RT-PCR protokolu z RNA izolované z různých biologických vzorků, například nasálních, nasofaryngeálních, orofaryngeálních nebo bukálních stěrů, nasofaryngeální tekutiny (aspirátu), nasofaryngeálního výplachu, slin, sputa, výplachů dutiny ústní a výplachů hltanu kloktáním – tzv. „gargling liquid“, stolice, moči, tkáňových biopsií, FFPE vzorků tkání anebo vody. Souprava je určena k použití jako pomůcka při diferenciální diagnostice SARS-CoV-2, IAV, IBV a RSV u lidí pomocí přístroje pro real-time PCR.

## 1.2 Souhrn a vysvětlení testu

RNA z virů SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B a RSV jsou detekovatelné ve vzorcích lidských horních cest dýchacích během infekce. Pozitivní výsledek ukazuje přítomnost SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B a/nebo RSV RNA. Pozitivní výsledek na kterýkoliv detekovaný virus však nevylučuje bakteriální infekci ani souběžnou infekci (koinfekci) jinými viry, a to včetně ostatních virů testovaných negativně v tomto testu. Negativní výsledek pro jakýkoliv virus nevylučuje infekci tímto virem a neměl by být používán jako jediný základ pro rozhodnutí o léčbě pacienta. Negativní výsledky musí být kombinovány s klinickými pozorováními, anamnézou pacienta a epidemiologickými informacemi.

Souprava RT-PCR Respiratory panel 1: SARS-CoV-2/Flu/RSV je určena pro použití výhradně kvalifikovaným personálem klinické laboratoře, speciálně vyškoleným v metodách *in vitro* diagnostiky real-time PCR.

## 1.3 Princip fungování testu

Souprava obsahuje primery a próby pro provedení real-time RT-PCR detekce RNA virů SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B a/nebo RSV, kdy fluorescence je detekována pomocí techniky TaqMan™ hydrolyzačních prób. Virus **SARS-CoV-2 je detekován v kanále FAM** pomocí amplifikace dvou segmentů genomové RNA v oblastech genů *EndoRNase* a konzervované části *Spike*, stejné sekvence jsou detekovány v soupravách DB-1211 a DB-1219, a byly tak prověřeny již v několika milionech provedených testů. Primery použité pro Influenza A i B jsou dle doporučení CDC s adaptacemi, aby odpovídaly i současně kolujícím kmenům, a cílí pro Influenza A do Matrix proteinu 1 (M1) na segmentu 7 a pro Influenza B cílí do Nonstructural protein 1 (NS-1) na segmentu 8. Primery pro Influenza A sekvenčně odpovídají nejčastějším subtypům H1N1, H1N1-pdm, H3N2, H5N1 i H7N9, ale i H2N2, H1N2, H5N6 a H9N2, a **Influenza A je detekována v kanále HEX**. Primery pro Influenza B sekvenčně odpovídají subtypům Victoria i Yamagata a **Influenza B je detekována v kanále Texas Red (TEX)**. Primery pro RSV jsou dle doporučení WHO s adaptacemi, aby odpovídaly i současně kolujícím kmenům, a cílí pro oba viry (RSV A i RSV B) na oblast RdRP. **RSV je detekován v kanále Cy5.5**.

Tato souprava je určena k detekci virové RNA z RNA izolované z různých biologických vzorků. Souprava obsahuje kontrolu izolace RNA a primery a próbu pro její detekci. **Doporučujeme přidat kontrolu ke každému vzorku ještě před izolací RNA**, aby bylo možné ověřit výtěžek izolace. Kontrolu přidejte do lyzačního/vazebného pufru ze soupravy pro izolaci RNA, který bude následně smíchán se vzorkem, ze kterého je RNA izolována. Tímto postupem se ověří jak účinnost samotné RT-PCR reakce (odhalí se případná inhibice), tak i dostatečný výtěžek izolace RNA, což je klíčový



předpoklad pro správnou diagnostiku. Méně preferovanou možností je přidání kontrolní RNA přímo do RT-PCR mixu – tímto způsobem se kontroluje pouze účinnost RT-PCR reakce. **Pro ověření správné funkce soupravy je nutné do každé analýzy přidat alespoň jednu negativní a alespoň jednu pozitivní kontrolu (dodávané v této soupravě).**

Pokud chcete virové RNA detekovat přímo v respiračních vzorcích bez předchozí izolace RNA, pak použijte soupravu DB-1251, která je stejného designu jako tato souprava (detekce stejných virů ve stejných kanálech za použití shodných primerů a prób), avšak je určena pro přímou detekci bez nutnosti izolace RNA.

## 1.4 Vhodné vzorky a kompatibilní odběrové sady

Tato souprava je vhodná pro detekci virové RNA izolované z různých biologických vzorků, např. nasálních, nasofaryngeálních, orofaryngeálních nebo bukálních stěrů, nasofaryngeální tekutiny (aspirátu), nasofaryngeálního výplachu, slin, sputa, výplachů dutiny ústní a výplachů hltanu kloktáním – tzv. „gargling liquid“, stolice, moči, tkáňových biopsií, FFPE vzorků tkání anebo vody s využitím souprav k tomu určených. Pro izolaci RNA mohou být použity jak kolonkové izolační soupravy, tak soupravy založené na magnetických částicích. Izolovaná RNA musí být eluována ve vodě, nebo v pufru, který neinhibuje RT-PCR reakci. Pro dosažení optimálních výsledků detekce SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B a RSV ze slin nebo z nosohltanových stěrů v UTM nebo PBS doporučujeme použití DIANA RNA izolačních soupravy Automated RNA Isolation Kit (Kat. č. DB-1206).

Vzorky slin a stěrů mohou být před izolací RNA inaktivovány, pokud je použita izolační sada DB-1206 Automated RNA Isolation Kit. Pokud jsou sliny v odběrových sadách na sliny DIANA Biotechnologies, tak je možné sliny inaktivovat v inkubátoru. Postupy inaktivace vzorků jsou popsány v návodu k použití pro DB-1206 Automated RNA Isolation Kit a jsou shodné s postupem pro bezizolační soupravu DB-1251 DBdirect™ Respiratory panel 1: SARS-CoV-2/Flu/RSV. Postup pro inaktivaci slin byl validován výrobcem, postup pro inaktivaci médií je pouze doporučením a je zodpovědností uživatele jej validovat pro každý typ média (ověřit na cca 10 pozitivních vzorcích, z nichž některé musí být slabé s Ct > 30, že inaktivace nevede ke snížení výtěžků RNA).

## 1.5 Kompatibilní automatizace a PCR přístroje

Tuto soupravu lze používat manuálně, ale i automatizovaně na automatických laboratorních pipetovacích strojích. Výrobce dodává potřebné protokoly a plastik pro automatizaci na pipetovací stanici Agilent Bravo. Souprava DB-1206 Automated RNA isolation Kit obsahuje plastik a reagentie pro automatizovanou izolaci RNA z různých biologických vzorků na pipetovací stanici Agilent Bravo a také pro následnou automatizovanou přípravu RT-PCR destičky. Souprava DB-1214 Agilent Bravo Installation Package for Automated RNA Isolation Kit obsahuje protokoly pro automatizaci izolace RNA na pipetovací stanici Agilent Bravo.

Tato souprava byla validována na strojích BioRad CFX96™ Real-Time PCR detekční systém (BioRad CFX96™) a BioRad CFX Opus 96 Real-Time PCR systém (BioRad CFX Opus 96), které nabízí dle výrobce shodné možnosti a mohou být používány s touto soupravou záměnně. Veškeré protokoly a nastavení popsané v tomto návodu k použití se vztahují a byly validovány pro tyto dva PCR stroje. Soupravu je ale možné používat i na dalších PCR strojích, přesné nastavení a validace protokolů je nicméně zodpovědností uživatele. Souprava využívá detekci v kanálech FAM, HEX, TEX, Cy5 a Cy5.5, avšak některé běžně používané stroje nemají detekci v Cy5.5, a proto na nich nemůže být RSV detekován. Validovat PCR protokol je možné buď změřením ředící řady vzorku o známé



koncentraci anebo změřením setu alespoň 10 klinických vzorků o známé koncentraci, z nichž by alespoň několik mělo být slabě pozitivních s Ct > 30.

## 2 Charakteristiky testu

### 2.1 Analytická reaktivita (inkluzivita)

Pro ověření schopnosti soupravy detekovat různé kmeny chřipky A a B, a RSV A a B bylo otestováno celkem 27 různých kmenů (3x Influenza A H1N1, 5x Influenza A H1N1 pandemic, 7x Influenza A H3N2, 8x Influenza B, 2x RSV A a 2x RSV B). Ty byly komerčně zakoupeny ve formě virové kultury a RNA z nich byla izolována soupravou DB-1206 Automated RNA Isolation Kit. RNA izolované z jednotlivých kultur (kmenů virů) byly otestovány ve třech různých ředěních (500x, 5000x a 50 000x, nejnížší testovaná koncentrace se lišila mezi virovými kmeny, ale byla vždy v rozsahu 0.002 až 0.4 TCID<sub>50</sub> „kopie“ v reakci) a výsledky měření byly vyhodnoceny dle návodu k použití pro DB-1250. Koncentrace virových kultur byly dodavatelem udávány v hodnotách TCID<sub>50</sub>/mL, a proto se výsledné LOD analýzy vztáhly na tyto jednotky.

**Souprava DB-1250 dokázala detekovat ve správném fluorescenčním kanále všechny testované kmeny chřipky A a B, a RSV A a B v množství menším než 1 TCID<sub>50</sub> v reakci.** V Tabulce 1 jsou pro každý testovaný kmen uvedeny hodnoty LOD na jednu reakci a v jednom mililitru (množství kopií viru je udáno v jednotkách TCID<sub>50</sub>) a dále přibližná hodnota Ct v případě přítomnosti 1 TCID<sub>50</sub> viru v reakci. Vzhledem k tomu, že jednotky TCID<sub>50</sub> zjednodušeně udávají počet infekčních částic, tak rozdílné hodnoty LOD pro dané kmeny nemusejí nutně znamenat rozdílnou citlivost detekce, ale budou spíše odrážet rozdílnou infektivitu daných kultur. Určení LOD pro každý kmen bylo provedeno na základě porovnání Ct hodnot získaných z analýzy dané kultury (vždy měřeny tři body o různých množstvích TCID<sub>50</sub>) a ředící řady standardu (použit jeden pro každý virus Influenza A nebo B nebo RSV) o známém množství kopií RNA. Na základě porovnání bylo určeno, kolika kopiím virové RNA odpovídá dané ředění TCID<sub>50</sub>, a z této hodnoty pak byla dopočítána hodnota LOD (dle LOD naměřeného pro kvantitativní standardy, viz kapitola limit detekce) v jednotkách TCID<sub>50</sub>.



**Tabulka 1: Výsledky detekce různých kmenů virů chřipek a RSV**

Virus	Kmen	LOD pro jednotlivé kmeny:		Ct pro 1 TCID <sub>50</sub> /reakce
		TCID <sub>50</sub> /reakce	TCID <sub>50</sub> /mL	
Influenza A H1N1	A/Singapore/63/04	0.03	6	32.6
Influenza A H1N1	A/Brisbane/59/07	0.004	0.9	29.8
Influenza A H1N1	A/Taiwan/42/06	0.1	20	34.3
Influenza A H1N1-pdm	A/Michigan/45/15	0.0006	0.1	27.0
Influenza A H1N1-pdm	A/California/07/09	0.0006	0.1	26.8
Influenza A H1N1-pdm	A/New York/18/09	0.001	0.3	28.2
Influenza A H1N1-pdm	A/NY/03/09	0.05	10	33.3
Influenza A H1N1-pdm	A/Mexico/4108/09	0.04	7	32.8
Influenza A H3N2	A/Perth/16/09	0.03	5	31.5
Influenza A H3N2	A/Texas/50/12	0.004	0.9	29.0
Influenza A H3N2	A/Hong Kong/4801/14	0.003	0.5	28.2
Influenza A H3N2	A/Wisconsin/67/05	0.009	2	30.0
Influenza A H3N2	A/Kansas/14/17	0.008	2	29.8
Influenza A H3N2	A/Brisbane/10/07	0.07	14	32.9
Influenza A H3N2	Singapore/INFIMH-16-0019/16	0.02	4	31.0
Influenza B	B/Brisbane/33/08	0.00007	0.01	22.1
Influenza B	B/Florida/04/06	0.0004	0.08	24.7
Influenza B	B/Brisbane/60/08	0.0007	0.1	25.5
Influenza B	B/Texas/2/13	0.0003	0.06	24.2
Influenza B	B/Victoria/504/00	0.002	0.5	27.2
Influenza B	B/Florida/02/06	0.0004	0.08	24.6
Influenza B	B/Colorado/06/17	0.0005	0.1	24.9
Influenza B	B/Malaysia/2506/04	0.002	0.3	26.5
RSV A	12/2014 Isolate #2	0.0001	0.02	23.9
RSV A	3/2015 isolate #3	0.0002	0.04	24.5
RSV B	CH93-18(18)	0.000004	0.0008	19.2
RSV B	3/2015 Isolate #1	0.00003	0.006	22.0

Tabulka shrnuje názvy kmenů (2. sloupec) jednotlivých virů (1. sloupec) a hodnoty TCID<sub>50</sub> v reakci a v mililitru (3. a 4. sloupec) v RNA izolované z jednotlivých kultur. V posledním sloupci je pak očekávaná hodnota Ct pro 1 TCID<sub>50</sub> kopií v reakci. Podrobnější popis a vysvětlení je v textu.

Pro detekci viru SARS-CoV-2 jsou v soupravě použité stejné primery jako v soupravách DB-1211 a DB-1219. Tyto soupravy jsou používány od začátku pandemie a bylo ověřeno, že dokáží bez změny citlivosti detekovat všechny významné varianty tohoto viru, tj. varianty „wild-type“, alfa, beta, gama, delta i omikron.

## 2.2 Limit detekce (LOD)

Limit detekce byl určen jako přibližný počet kopií v reakci, při kterém vyjde 95 % jamek pozitivně. Pro určení LOD byly použity kvantitativní standardy od firmy Vircell. Pro každou testovanou koncentraci byl změřen 24-plikát a podle počtu pozitivních jamek byl určen LOD. **Tabulka 2** shrnuje přibližné LOD<sub>95%</sub>. Pro RSV jsou reálné hodnoty pravděpodobně lepší, protože pro stanovení byly použity staré kmeny RSV, které se od dnešních liší a nesou záměny v cílených sekvencích oproti použitým primerům. LOD je udáván v počtu kopií na jamku (druhý sloupec), ale i jako koncentrace v mL vzorku (třetí sloupec) za předpokladu, že je pro test použito 5 µL izolované RNA a při izolaci



nedojde k zakoncentrování vzorku (při izolaci kdy dojde k pětinasobnému zakoncentrování bude LOD na mL 5x nižší).

**Tabulka 2: LOD<sub>95%</sub> pro vybrané cílené viry**

DB-1250	LOD <sub>95%</sub> v jamce	LOD <sub>95%</sub> mL <sup>-1</sup> (5 µL vzorku)
SARS-CoV-2	2	400
IAV H1N1-pdm	5	1000
IAV H3N2	10	2000
IBV Victoria	5	1000
RSV A	5	1000
RSV B	10	2000

## 2.3 Intraassay a Interassay variabilita

Pro vybrané virové cíle (SARS-CoV-2, Influenza A H1N1-pdm, Influenza A H3N2, Influenza B Victoria, RSV A a RSV B) byla testována intra a interassay variabilita. Od každého cíle byly testovány tři koncentrace (1000 nebo 100 nebo 25 kopií v jamce) v osmi replikátech (1000 kopií pouze ve čtyřech) na třech různých destičkách, ve třech různých PCR strojích a vše bylo připraveno třemi různými operátory. Jako zdroj virových RNA byly použity komerční kvantifikované standardy RNA od výrobce Vircell. Pokus byl proveden na stroji BioRad CFX96™.

Z variance mezi jamkami v rámci jedné destičky byly spočítány standardní odchylky pro intraassay variability, a z variance mezi jamkami mezi destičkami byly spočítány standardní odchylky pro interassay variability. Ze všech měření jedné koncentrace jednoho viru bylo spočítáno očekávané Ct jako průměr získaných Ct hodnot. V **Tabulce 3, 4 a 5** jsou všechny tyto tři parametry uvedeny pro každý z testovaných virů. Číslo vždy udává průměrnou hodnotu dané veličiny (respektive u standardních odchylek odmocninu průměru variancí v počtu cyklů) a v závorce je poté uvedeno rozmezí, které je definováno minimální a maximální hodnotou pro danou veličinu. V posledním řádku v **Tabulce 3** je uveden průměr přes všechny detekované RNA uvnitř jednoho měření (intraassay), v **Tabulce 4** je uveden průměr přes všechny detekované RNA mezi dvěma měřeními (interassay variability) a v **Tabulce 5** je uveden průměr přes všechny detekované RNA vyjma kontroly (IC).

**Tabulka 3: Hodnoty intraassay variability**

Kit	RNA	Kanál	Intraassay Variabilita		
			1000 kopií	100 kopií	25 kopií
DB-1250	SARS-CoV-2	FAM	0.10 (0.05-0.12)	0.12 (0.09-0.17)	0.29 (0.13-0.40)
DB-1250	IAV H1N1pdm	HEX	0.12 (0.06-0.15)	0.33 (0.20-0.38)	0.62 (0.49-0.78)
DB-1250	IAV H3N2	HEX	0.13 (0.09-0.15)	0.40 (0.20-0.55)	0.71 (0.39-1.08)
DB-1250	IBV	TEX	0.07 (0.05-0.10)	0.19 (0.11-0.27)	0.31 (0.27-0.34)
DB-1250	RSV A	Cy5.5	0.06 (0.03-0.09)	0.17 (0.12-0.22)	0.44 (0.20-0.61)
DB-1250	RSV B	Cy5.5	0.13 (0.10-0.16)	0.35 (0.20-0.44)	0.78 (0.40-0.99)
DB-1250	IC	Cy5	0.21 (0.07-0.42)	0.16 (0.10-0.21)	0.16 (0.09-0.23)
DB-1250	All	All	0.11 (0.03-0.16)	0.28 (0.09-0.55)	0.56 (0.13-1.08)





**Tabulka 4: Hodnoty interassay variability**

Kit	RNA	Kanál	Interassay Variabilita		
			1000 kopií	100 kopií	25 kopií
DB-1250	SARS-CoV-2	FAM	0.23 (0.17-0.30)	0.21 (0.12-0.26)	0.32 (0.21-0.37)
DB-1250	IAV H1N1pdm	HEX	0.25 (0.13-0.34)	0.40 (0.39-0.41)	0.56 (0.41-0.70)
DB-1250	IAV H3N2	HEX	0.29 (0.02-0.36)	0.46 (0.34-0.52)	0.78 (0.71-0.90)
DB-1250	IBV	TEX	0.29 (0.08-0.38)	0.35 (0.23-0.44)	0.40 (0.23-0.53)
DB-1250	RSV A	Cy5.5	0.33 (0.23-0.46)	0.29 (0.24-0.36)	0.65 (0.30-0.82)
DB-1250	RSV B	Cy5.5	0.35 (0.21-0.47)	0.38 (0.28-0.49)	0.86 (0.65-0.95)
DB-1250	IC	Cy5	0.45 (0.10-0.70)	0.37 (0.15-0.50)	0.38 (0.15-0.53)
DB-1250	All	All	0.29 (0.02-0.47)	0.36 (0.12-0.52)	0.63 (0.21-0.95)

**Tabulka 5: Očekávané hodnoty Ct**

Kit	RNA	Kanál	Očekávané hodnoty Ct		
			1000 kopií	100 kopií	25 kopií
DB-1250	SARS-CoV-2	FAM	26.72 (26.53-26.95)	29.98 (29.81-30.13)	32.01 (31.89-32.24)
DB-1250	IAV H1N1pdm	HEX	29.64 (29.43-29.90)	33.01 (32.88-33.25)	35.23 (35.06-35.50)
DB-1250	IAV H3N2	HEX	30.13 (29.97-30.44)	33.49 (33.27-33.86)	35.74 (35.33-36.11)
DB-1250	IBV	TEX	28.44 (28.23-28.76)	31.66 (31.39-31.97)	33.52 (33.23-33.91)
DB-1250	RSV A	Cy5.5	29.77 (29.45-30.09)	32.90 (32.67-33.16)	34.65 (34.38-35.17)
DB-1250	RSV B	Cy5.5	30.73 (30.38-31.03)	33.85 (33.64-34.08)	36.04 (35.42-36.43)
DB-1250	IC*	Cy5	30.76 (30.48-31.37)	30.43 (30.15-30.83)	30.42 (30.10-30.84)
DB-1250	All	All	29.24 (26.53-31.03)	32.48 (29.81-34.08)	34.53 (31.89-36.43)

\*Počet kopií izolační kontroly (IC) je ve všech třech reakcích shodný.

## 2.4 Testování kompetitivní interference (detekce koinfekcí)

Tato souprava dokáže detekovat koinfekce dvěma a více viry najednou, ale pokud je nějaký z kanálů silně pozitivní, může docházet ke zhoršení citlivosti detekce ostatních virů v ostatních kanálech. Pro posouzení citlivosti detekce koinfekcí byla otestována detekce RNA různých virů v malé koncentraci, pokud se nacházely ve směsi s jinou virovou RNA ve velké koncentraci. Vzhledem k vysoké infekčnosti SARS-CoV-2 je nejpravděpodobnější koinfekce virem SARS-CoV-2 v kombinaci s chřipkou nebo RSV, a proto jsme testovali tyto kombinace.

V první sadě testů jsme otestovali detekci malé koncentrace RNA virů Influenza A, Influenza B, RSV A a RSV B (koncentrace 3x LOD, 10x LOD a 50x LOD) pokud se nacházejí ve směsi s velkou koncentrací virové RNA SARS-CoV-2 (s Ct cca 20 cyklů, což odpovídá více než 10 000x LOD) a v druhé sadě testů jsme otestovali detekci malé koncentrace RNA SARS-CoV-2 (3x LOD, 10x LOD a 50x LOD) v přítomnosti velké koncentrace RNA virů Influenza A, Influenza B, RSV A a RSV B (Ct cca 25 cyklů, což odpovídá cca 1 000x LOD). **Tabulka 6** shrnuje naměřené výsledky pro koinfekce.





**Tabulka 6: Schopnost detekce slabé koinfekce (kompetitivní interference)**

Virus 1 (Ct~20)	Virus 2	Virus 2 detekce	Virus 1 (Ct~25)	Virus 2	Virus 2 detekce
SARS-CoV-2	IAV H3N2	3x LOD	IAV H3N2	SARS-CoV-2	3x LOD
SARS-CoV-2	IBV	3x LOD	IBV	SARS-CoV-2	3x LOD
SARS-CoV-2	RSV A	10x LOD	RSV A	SARS-CoV-2	3x LOD
SARS-CoV-2	RSV B	50x LOD	RSV B	SARS-CoV-2	3x LOD

V případě, že se ve vzorku vyskytovala velká koncentrace SARS-CoV-2 RNA, pak byla pozorována slabší amplifikace pro malé koncentrace ostatních virů. Přesto byly RNA virů Influenza A a Influenza B detekovány už od koncentrace 3x LOD, zatímco RSV A od koncentrace 10x LOD a RSV B od koncentrace 50x LOD a pro všechny detekované RNA byla snížená fluorescence. Na druhou stranu, pokud byla v jamce velká koncentrace Influenza A, Influenza B, RSV A nebo RSV B a malá koncentrace SARS-CoV-2, tak ta byla spolehlivě detekována již od nejnižší testované koncentrace, tj. 3x LOD, a její detekce tak nebyla ovlivněna.

Detekce SARS-CoV-2 v přítomnosti velké koncentrace RNA ostatních virů oslabena není a je spolehlivá i v malé koncentraci (3x LOD). Naproti tomu detekce ostatních virů, zvláště RSV A a RSV B, je v přítomnosti vysoké koncentrace SARS-CoV-2 oslabena. Zatímco Influenza A a B byly stále detekovatelné i při koncentraci 3x LOD (i když se sníženou fluorescencí), RSV A RNA byla detekovaná při koncentraci 10x LOD a RSV B až od 50x LOD. A i proto nesmí být negativita v jakémkoliv kanálu použita jako jediné vodítko pro vyloučení infekce daným virem.

## 2.5 Klinická výkonnost, souhrnné výsledky

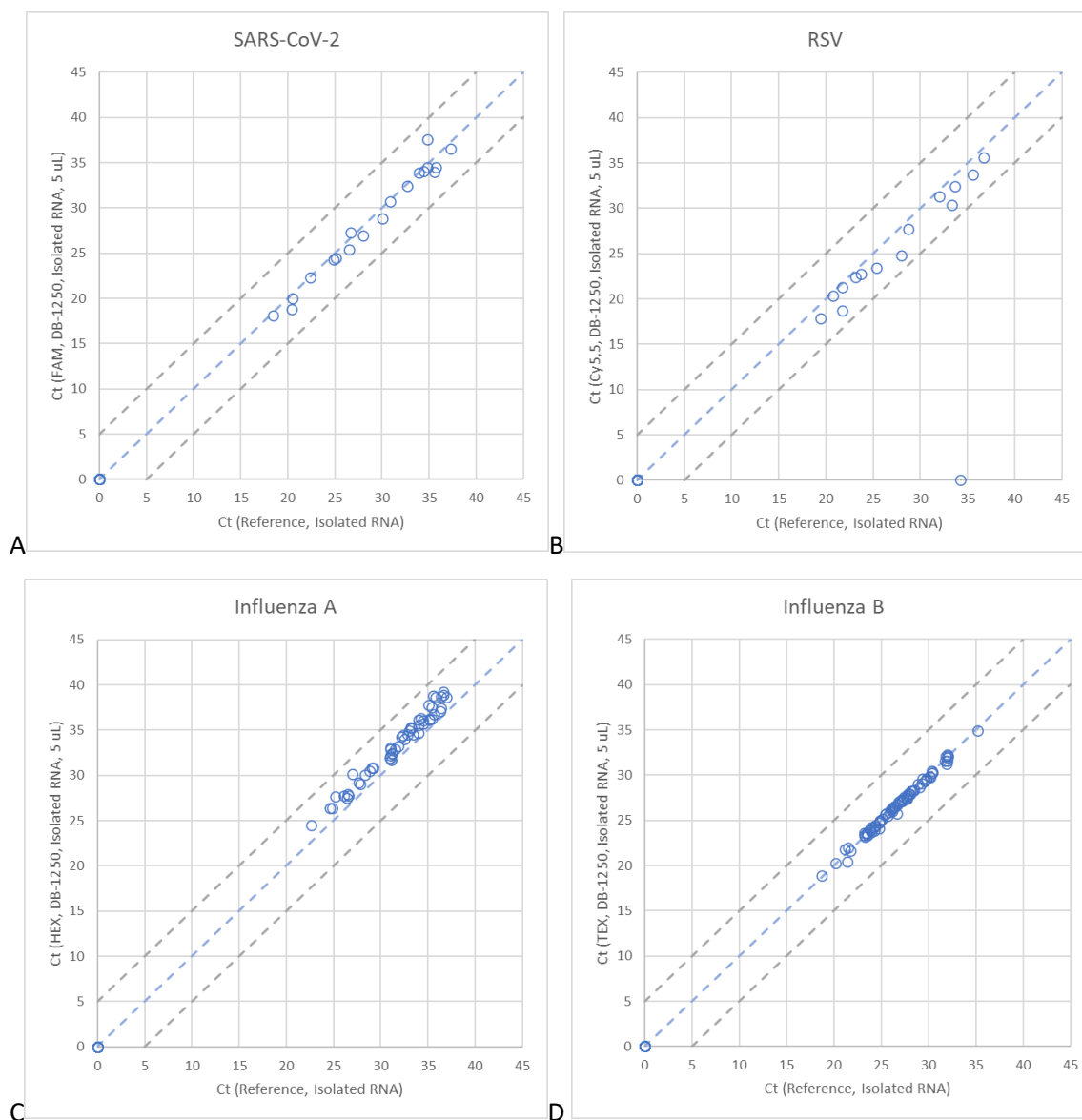
Celkem 186 vzorků nosohltanových stěrů a 386 vzorků slin, které byly odebrány jedincům z evropské populace pro indikované i preventivní testování pro COVID-19 a jiná respirační onemocnění, bylo pro každý virus otestováno vždy alespoň dvěma referenčními soupravami a výsledky byly porovnány s výsledky detekce těchto virů touto soupravou. Ze vzorků byla izolována RNA pomocí soupravy DB-1206 Automated RNA Isolation Kit od výrobce DIANA Biotechnologies. Následně byly v izolované RNA detekovány jednotlivé viry dle pokynů výrobce použité RT-PCR soupravy, ať už v multiplexu nebo jednotlivě (podle designu referenční soupravy). Pozitivní vzorky stěrů i slin na SARS-CoV-2 pocházejí z roku 2022 a jsou to varianta omikron. Vzorky stěrů pozitivní na RSV pocházejí z roku 2021 a sliny pozitivní na RSV z roku 2022. Vzorky stěrů pozitivních na Influenza A pocházejí z roku 2019, vzorky stěrů pozitivních na Influenza B z let 2017 a 2018 a vzorky slin pozitivních na Influenza A i B pocházejí z roku 2022. Vzorky pocházejí z několika různých laboratoří a stěry byly v různých transportních médiích.

Výsledky porovnání pro nosohltanové stěry jsou zobrazeny na **Obrázku 1** a pro sliny na **Obrázku 2**, kde jsou v grafech porovnány hodnoty Ct naměřené touto soupravou a referenčními soupravami (každý virus v jednom grafu). Počty TP („true positive“), FN („false negative“), TN („true negative“) a FP („false positive“) jsou uvedeny v **Tabulce 7**. V tabulce jsou vypočteny také hodnoty PPA („positive percent agreement“) a NPA („negative percent agreement“). V případě několika FN vzorků se jednalo o vzorky, ve kterých došlo ke koinfekci, kdy jeden z virů (SARS-CoV-2) byl ve vysoké náloži, a druhý virus byl v nízké koncentraci (Ct okolo 35. cyklu). V těchto vzorcích byl SARS-CoV-2 detekován, nebyl ale detekován druhý virus ve slabé koncentraci. Protože jsme výsledky porovnávali i se soupravami, které viry detekovaly jednotlivě (a v multiplexu nebyl SARS-CoV-2), tak je v tabulce vypočtena hodnota PPA\*, ve které nebyly zohledněny tyto FN výsledky (respektive byly považovány za TN).

„Positive percent agreement“ (PPA) prostředku dosáhl ve vzorcích slin a stěrů pro SARS-CoV-2 98.4 %, pro Influenza A 94.8 %, pro Influenza B 100.0 % a pro RSV 100.0 %, zatímco „negative percent agreement“ (NPA) pro dané viry dosáhl postupně 99.8 %, 100.0 %, 100.0 % a 99.8 %.



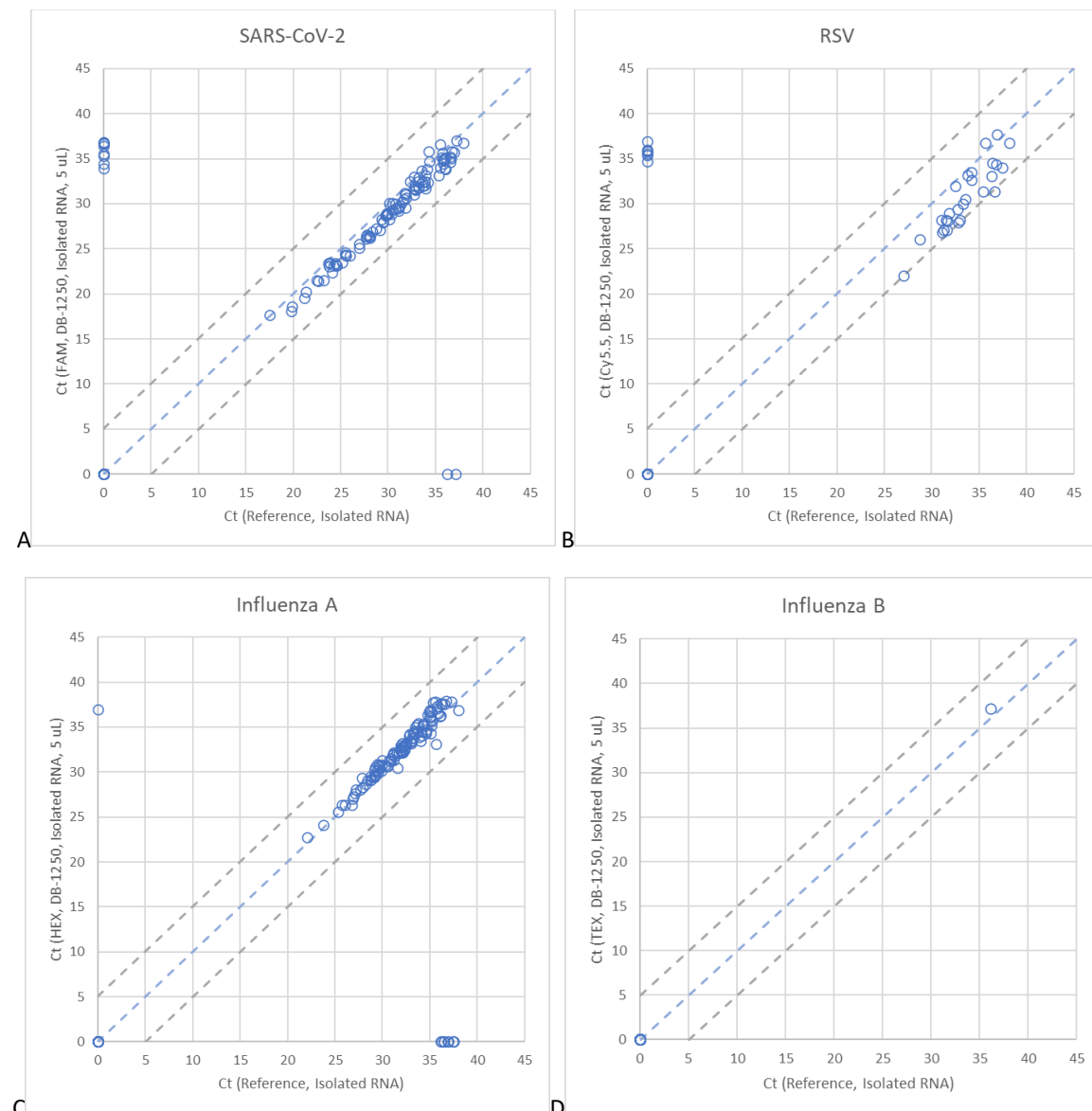
Hodnoty PPA i NPA prokazují, že prostředek je vhodný a účinný pro detekci RSV, Influenza A a B a SARS-CoV-2 virů.



**Obrázek 1: Porovnání naměřených Ct pro vzorky nosohltanových stěrů s referenčními měřeními**

Detekce každého viru je v jednom grafu, na ose y grafu je vyneseno odpovídající kanál soupravy DB-1250. Konkrétně je vyneseno Ct z měření touto soupravou (osa y) porovnané s Ct naměřenými referenčními soupravami (osa x). Pokud byl signál naměřen pouze v jedné referenční soupravě (Ct <37), pak je zde vyneseno toto Ct, pokud bylo Ct v obou soupravách pod 40 (a alespoň v jedné pod 37), tak je vyneseno průměr obou Ct. Hodnoty ležící na ose x značí, že daný vzorek byl detekován pouze v referenčních soupravách, zatímco hodnoty na ose y značí, že vzorek byl detekován pouze v DB-1250 soupravě.





**Obrázek 2: Porovnání naměřených Ct pro vzorky slin s referenčními měřeními**

Detekce každého viru je v jednom grafu, na ose y grafu je vyneseno odpovídající kanál soupravy DB-1250. Konkrétně je vyneseno Ct z měření touto soupravou (osa y) porovnané s Ct naměřenými referenčními soupravami (osa x). Pokud byl signál naměřen pouze v jedné referenční soupravě (Ct < 37), pak je zde vyneseno toto Ct, pokud bylo Ct v obou soupravách pod 40 (a alespoň v jedné pod 37), tak je vyneseno průměr obou Ct. Hodnoty ležící na ose x značí, že daný vzorek byl detekován pouze v referenčních soupravách, zatímco hodnoty na ose y značí, že vzorek byl detekován pouze v DB-1250 soupravě. Pro SARS-CoV-2 i RSV bylo detekováno několik vzorků pouze v soupravě DB-1250 a nikoliv v referenční soupravě (viz body na osách y). Při bližší analýze (**Tabulka 7**) je vidět, že velká část z nich byla v některém z referenčních měření hraničně pozitivní a zbytek vzorků jde patrně na vrub vyšší citlivosti detekce soupravou DB-1250 na tyto viry. Všechny tyto vzorky jsou s Ct > 30 a zároveň hodnoty Ct jsou v DB-1250 oproti referenci nižší v průměru o dva cykly pro SARS-CoV-2 a tři cykly pro RSV, a je tak velká pravděpodobnost, že se jedná o slabé vzorky, které nebyly v referenčním měření zachyceny.



**Tabulka 7: Výsledky určení NPA a PPA pro vzorky nosohltanových stěrů a slin**

Vzorek	Interpretace	TP	FN	TN	FP	FP <sup>2</sup>	FP <sup>1</sup>	PPA	PPA*	NPA
Nosohltanové stěry	SARS-CoV-2	19	0	167	0	0	0	100.0%	100.0%	100.0%
	Influenza A	52	0	134	0	0	0	100.0%	100.0%	100.0%
	Influenza B	78	0	108	0	0	0	100.0%	100.0%	100.0%
	RSV	14	1	171	0	0	0	93.3%	100.0%	100.0%
Sliny	SARS-CoV-2	99	2	259	8	3	4	98.1%	98.1%	99.6%
	Influenza A	111	10	246	1	1	0	91.8%	92.6%	100.0%
	Influenza B	1	0	367	0	0	0	100.0%	100.0%	100.0%
	RSV	27	0	334	7	1	5	100.0%	100.0%	99.7%
Nosohltanové stěry + sliny	SARS-CoV-2	118	2	426	8	3	4	98.4%	98.4%	99.8%
	Influenza A	163	10	380	1	1	0	94.3%	94.8%	100.0%
	Influenza B	79	0	475	0	0	0	100.0%	100.0%	100.0%
	RSV	41	1	505	7	1	5	97.9%	100.0%	99.8%

Všechny vzorky byly nejprve změřeny dvěma referenčními soupravami a jako pozitivní byly považovány všechny vzorky s Ct v alespoň jedné ze souprav pod 37 cyklů. Následně byly vzorky změřeny soupravou DB-1250 a vzorky, které měly Ct pod 37 anebo pod 40 a zároveň byly pozitivní v referenci, tak byly považovány za pozitivní. Pokud se pozitivita shodovala s referencí, pak byly považovány za **TP**, pokud byly pozitivní pouze v DB-1250, tak za **FP**. V případě FP bylo ještě prověřeno, zda nebyly tyto vzorky hraničně pozitivní v jedné referenční soupravě (v jedné měl vzorek Ct 37 až 40 a v druhé byl negativní, sloupec **FP<sup>1</sup>**) nebo obou referenčních soupravách (v obou měl vzorek Ct mezi 37 až 40, sloupec **FP<sup>2</sup>**). Tyto pozitivní vzorky byly považovány pro účel výpočtu PPA a NPA jako TP (jejich součet byl přičten k TP a odečten od FP). Za **FN** byly považovány vzorky pozitivní pouze v referenci, zatímco za **TN** vzorky negativní v DB-1250 i v referenci. **PPA** bylo vypočteno jako počet TP lomeno součet TP a FN, zatímco **NPA** bylo vypočteno jako TN lomeno součet TN a FP. **PPA\*** bylo vypočteno stejným způsobem jako PPA, avšak FN vzorky byly považovány za TN pokud platilo, že nebyl detekován virus s Ct >35, který byl ve vzorku zároveň s dalším virem s Ct <25. Tj. pokud nebyl detekován virus, který byl ve vzorku zároveň s dalším virem o mnohem vyšší náloži, podrobnosti viz text. Celkem se jednalo o 2 vzorky.

### 3 Bezpečnostní upozornění

Tato souprava je určena pouze pro profesionální použití. Dodržujte obecné zásady chemické bezpečnosti. Používejte ochranné pomůcky (rukavice, brýle), zamezte přímému kontaktu s chemikáliemi a vyvarujte se jídlu nebo pití v laboratořích.



Při práci s biologickými vzorky věnujte pozornost bezpečnostním pravidlům pro práci s infekčním biologickým materiálem, používejte vhodné ochranné vybavení (např. štít, respirátor) a pracujte se vzorky pouze ve vyhrazených biohazard boxech nebo ve vyhrazených pracovních prostorech. S infekčními vzorky pracujte pouze v laboratořích kategorie BSL2+ nebo BSL3. Potenciálně infekční odpad zlikvidujte v souladu s platnými právními předpisy, interními postupy laboratoře a bezpečnostními listy soupravy.



Průběžně kontrolujte, zda v pracovním prostoru nejsou rozlité chemikálie nebo biologické vzorky. V případě rozlití pracovní plochu okamžitě dekontaminujte. Pokud dojde ke kontaktu reagentů s pokožkou nebo k zasažení očí, okamžitě postižené místo opláchněte pod tekoucí vodou.



## 4 Seznam materiálu

### 4.1 Požadované laboratorní vybavení

- Real-time PCR cykler se softwarem schopným multiplexní detekce v kanálech FAM, HEX, Texas Red, Cy5 a Cy5.5 – **postupujte podle návodu poskytnutého výrobcem daného přístroje**
- Kalibrované jednorázové/multikanálové pipety
- Rukavice a jiné ochranné prostředky

### 4.2 Doporučené laboratorní vybavení

- Stolní vortex a centrifuga
- V případě použití automatizovaného protokolu: pipetovací robot (doporučena je např. pipetovací stanice Agilent Bravo)

### 4.3 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy

- Jednorázové pipetovací špičky (doporučujeme špičky s filtrem)
- Jednorázové zkumavky pro míchání jednotlivých složek
- PCR destička a adhezivní optická fólie pro zalepení PCR destičky
- Soupravy nebo reagentie pro izolaci RNA (např. DB-1206)
- Materiál, který bude sloužit jako negativní kontrola (viz kapitola 5.3)
- V případě použití automatizovaného protokolu: protokoly a plastik pro automatizaci (např. instalační balíček DB-1214 a sada DB-1206 pro pipetovací stanici Agilent Bravo)

### 4.4 Materiál, který je součástí soupravy

Tabulka 8: Složky soupravy DB-1250

Souprava <sup>[8]</sup>	Složky soupravy <sup>[8]</sup>	REF kód <sup>[7]</sup>	Objem (μL) <sup>[6]</sup>	Podmínky skladování	Popis a barva víčka
DB-1250-100rxns	Enhancer mix (4x)	RF00772	500	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	1
	Primer mix (4x)	RF09005	500	≤ -18 °C <sup>[1,2,3]</sup>	2
	Enzyme mix (4x)	RF06854	500	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	3
	Positive control A	RF07239	150	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	4A
	Positive control B	RF06263	150	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	4B
	Isolation control <sup>[4]</sup>	RF05323	150	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	5
DB-1250-1000rxns	Enhancer mix (4x)	RF00772	5000	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	1 <sup>[5]</sup>
	Primer mix (4x)	RF09005	5000	≤ -18 °C <sup>[1,2,3]</sup>	2 <sup>[5]</sup>
	Enzyme mix (4x)	RF06854	5000	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	3 <sup>[5]</sup>
	Positive control A	RF07239	2x 750	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	4A
	Positive control B	RF06263	2x 750	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	4B
	Isolation control <sup>[4]</sup>	RF05323	2x 750	≤ -18 °C <sup>[2,3]</sup>	5



**[1] Uchovávejte na temném místě** (obsahuje látky, které jsou citlivé na světlo). **[2] Skladujte celou soupravu při teplotě -18 °C nebo nižší.** Přeprava prostředku musí probíhat na suchém ledu a je povinností distributora zajistit jeho dostatečné množství po celou dobu přepravy. Nepoužívejte soupravu, pokud složky byly při



do dáání rozmrazené, jejich stav při předání zkontrolujte, pokud v přepravním boxu nebyl suchý led či ho bylo málo. **[3] Minimalizujte počet zamrazení/rozmrazení**, roztoky rozalíkvotujte po prvním rozmrazení. **[4]** Přidejte do lyzačního/vazebného pufru před extrakcí RNA nebo přímo do RT-PCR mixu. **[5]** V soupravách pro 1000 reakcí mají složky č. 1-3 průhledná víčka. **[6]** Do zkumavek je plněn objem o 10 % vyšší, než je uvedeno v tabulce. **[7]** REF kódy a čísla šarží (LOT) soupravy i jednotlivých složek jsou uvedeny na obalu, obal proto pro referenci zachovejte, dokud nespotebujete celou soupravu. Nemíchejte složky z různých šarží souprav. **[8]** Na obalu soupravy i jednotlivých složek soupravy jsou uvedeny čárové kódy se základními informacemi.

### Enhancer Mix (4x)

Obsahuje různé soli zvyšující účinnost RT-PCR reakce. Dodáván jako 4x koncentrát.

### Primer Mix (4x)

Obsahuje primery a hydrolyzační próby pro detekci SARS-CoV-2 (FAM), Influenza A (HEX), Influenza B (TEX), RSV (Cy5.5) a izolační kontroly (Cy5). Dodáván jako 4x koncentrát.

### Enzyme Mix (4x)

Obsahuje termostabilní reverzní transkriptázu, "hot-start" Taq polymerázu, nukleotidy, pufr, soli, detergenty, inhibitory RNáz a další aditiva. Dodáván jako 4x koncentrát.

### Positive control A a Positive control B

Pozitivní kontrola 4A obsahuje směs genomové RNA virů SARS-CoV-2, Influenza A H3N2, Influenza B Victoria a RSV B. Pozitivní kontrola 4B obsahuje směs genomové RNA virů SARS-CoV-2, Influenza A H1N1 pandemic, Influenza B Victoria a RSV A. Otevření těchto lahvíček může způsobit kontaminaci pracovního prostoru, proto tyto **vialky před otevřením vždy stočte!**

### Isolation control

Obsahuje RNA uměle vytvořenou sekvenci o délce přes 2000 bází. Tato RNA se přidává do každého vzorku před izolací RNA za účelem kontroly účinnosti izolace a odhalení případné inhibice RT-PCR reakce.

## 4.5 Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu

**Složky 1, 2 a 3 (Enhancer, Primer a Enzyme Mix) dlouhodobě skladujte při teplotě -18 °C nebo nižší** (doba použitelnosti je uvedena na obalu). Vyhněte se opakovanému zamrazení/rozmrazení, nikdy nepřekračujte čtyři cykly zamrazení/rozmrazení. Pokud budete tyto složky používat vícekrát, rozalíkvotujte je po prvním rozmrazení.

**Složky 1, 2 a 3** jsou stabilní přinejmenším 4 hodiny při 25 °C, pokud nejsou smíchané dohromady, avšak doporučujeme složky použít co nejdříve po rozmrazení. Uchovávejte složky soupravy mimo přímé sluneční světlo, působení běžného denního světla po dobu přinejmenším 8 hodin nemá vliv na jejich funkci. Primer mix by ale měl být dlouhodobě uchováván na tmavém místě.

**RT-PCR Master Mix** (směs složek 1, 2 a 3; viz kapitola 5.6) je stabilní po dobu až 2 hodin při 25 °C, avšak doporučujeme RT-PCR master mix použít (smíchat se vzorky) do 30 minut od jeho přípravy. Master mix uchovávejte mimo přímé sluneční světlo, působení běžného denního světla po dobu přinejmenším 8 hodin nemá vliv na jeho funkci.

**RT-PCR Master Mix** může být jednou zamrazen. Lze si tedy předem připravit master mix pro několik PCR destiček, nicméně vše musí být rozalíkvotováno a zamrazeno co nejdříve po přípravě master mixu. Je nutné zamrazení při teplotě ≤ -70 °C a následně je možné skladovat až 1 měsíc při teplotě -70 °C nebo nižší (viz kapitola 5.6).





**Složky 4 a 5 (pozitivní a izolační kontroly)** obsahují RNA, rozmrazujte je na dobu nezbytně nutnou a uchovávejte je na ledu, avšak mohou být skladovány kumulativně přinejmenším 24 hodin na pokojové teplotě. Vyhněte se opakovanému zamrazení/rozmrazení pozitivní a izolační kontroly, nepřekračujte čtyři cykly zamrazení/rozmrazení. Optimální teplota pro dlouhodobé skladování je -18 °C nebo nižší.

## 5 Návod k použití

### 5.1 Obecné postupy

- Nepoužívejte součásti soupravy, které jsou při přijetí poškozené nebo rozmrazené. Jejich stav při předání zkontrolujte, pokud v přepravním boxu nebyl suchý led či ho bylo málo. Uschovejte je pro případnou reklamaci a kontaktujte výrobce.
- Nesprávné zacházení se složkami soupravy a nedodržení postupů uvedených v tomto návodu k použití může nepříznivě ovlivnit výsledky.
- Používejte stejnou verzi a aktuální revizi návodu k použití (viz záhlaví), která je uvedena na obalu.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti, která je uvedena na obalu.
- Nemíchejte složky z různých šarží souprav (číslo šarže složky je uvedeno na vialce).

### 5.2 Jak zamezit kontaminacím (falešně pozitivním výsledkům)

Je třeba dodržovat správnou laboratorní praxi, aby se zabránilo křížové kontaminaci vzorků, a používat jednorázové pipetovací špičky s filtry, které se mění pro každý krok protokolu.

Manipulace s klinickými vzorky, pozitivními kontrolami (templátová RNA) nebo amplifikovanými PCR produkty (templátová DNA) by měla být prostorově oddělena od manipulace se zásobními složkami 1, 2 a 3, aby se minimalizovalo riziko náhodných kontaminací templátovou RNA/DNA. Nejlepší praxí je připravit RT-PCR master mix ze složek 1, 2 a 3 a napipetovat tuto směs do PCR destičky v prostoru, ve kterém se nepracuje s templátovou RNA/DNA (např. PCR box). Tento prostor by měl mít vyhrazené vybavení (např. pipety, laboratorní plastik), které se nepoužívá pro jiné účely a které nikdy nepřichází do styku s templátovou RNA/DNA. PCR destičky s master mixem by následně měly být přeneseny na jiné místo (např. do jiného PCR boxu), kde jsou přidány vzorky nebo pozitivní kontroly.

Další obecné pokyny, jak zabránit náhodné kontaminaci:

- **Nikdy neotvírejte zkumavku/destičku s amplifikovanými PCR produkty.**
- Nikdy neotvírejte nebo jinak nemanipulujte se vzorky, pozitivními kontrolami nebo s amplifikovanými PCR produkty v prostorech, ve kterých je připravován RT-PCR mix.
- Před manipulací s templátovou RNA/DNA uzavřete ostatní lahvičky s reagensy a před otevřením vždy vialku s pozitivní kontrolou řádně stočte.
- Nádoby s reagensy nechávejte otevřené pouze po dobu nezbytně nutnou.
- K ředění vzorku použijte ultračistou nebo PCR grade vodu (nebo z ní připravené pufr).

### 5.3 Požadované kontroly v každém stanovení

Pro odhalení případných falešně pozitivních a falešně negativních výsledků je nutné přidat pozitivní a negativní kontrolu na každou RT-PCR destičku. Negativní kontrolu lze vytvořit dvěma způsoby. Nejlepší je provést izolaci RNA se známým negativním vzorkem nebo s čistým médiem a přidat stejné množství eluátu do RT-PCR mixu, jako by se jednalo o skutečný vzorek. Taková





negativní kontrola odhalí kontaminaci v kterémkoliv kroku procesu. Druhý způsob negativní kontroly je méně robustní a spočívá v přímém přidání čistého elučního roztoku nebo ultračistě/PCR grade vody do RT-PCR mixu, jako by se jednalo o vzorek. Tento postup ale odhalí pouze kontaminaci elučního pufru nebo RT-PCR mixu. Jako pozitivní kontrolu použijte ideálně obě pozitivní kontroly, které jsou součástí soupravy (Positive control A a Positive control B, vialky č. 4A a 4B), anebo alespoň jednu z nich.

## 5.4 Než začnete

Složky soupravy jsou dodány a skladovány zamrazené, proto před každým použitím:

- Rozmrazte složky na pokojové teplotě (nerozmrazujte na ledu či v lednici).
- Před otevřením každou vialku stočte, abyste shromáždili veškerou tekutinu na dně.
- Před použitím reagentie promíchejte ve vialkách pomocí vortexu nebo pipetováním. Pipeta by měla být pro míchání nastavena minimálně na ½ objemu míchaného roztoku, pro správné promíchání je zapotřebí několikeré propipetování. Dostatečné promíchání je obzvláště důležité před rozdělením do alikvotů. Pokud vialku vortexujete, vždy ji před otevřením krátce stočte.

## 5.5 Přidání kontroly izolace RNA (Isolation control)



Kontrola izolace RNA (izolační kontrola) by měla být přidána do lyzačního/vazebného pufru před přidáním vzorku a následnou RNA izolací. Do lyzačního/vazebného pufru přidejte **1 µL RNA z vialky Isolation control (vialka č. 5, fialové víčko ●)** pro každý izolovaný vzorek (například do objemu lyzačního/vazebného pufru pro 10 izolací použijte celkem 10 µL). Tento postup důrazně doporučujeme, protože pro každý vzorek odhalí nejen případnou inhibici RT-PCR reakce, ale také případnou sníženou účinnost izolace RNA.

Pokud není možné přidat kontrolu izolace RNA do vzorku před samotnou izolací RNA, přidejte **0.1 µL z vialky Isolation control (vialka č. 5, fialové víčko ●)** pro každou reakci přímo do RT-PCR master mixu (například do master mixu pro deset reakcí přidejte 1 µL, viz 5. krok v kapitole 5.6).

## 5.6 Příprava RT-PCR master mixu

**Příprava RT-PCR master mixu pro jednu reakci je popsána níže.** Pokud připravujete RT-PCR master mix pro více reakcí, vynásobte objemy počtem reakcí (a připočtete pipetovací rezervu) – viz také **Tabulka 9**.

1. Rozmrazte a promíchejte všechny složky RT-PCR master mixu (viz **Tabulka 9** a kapitola 4.4).
2. Do čisté RNase/DNase free vialky napipetujte **5 µL Enhancer mixu (4x), v soupravě vialka č. 1 (zelené ● nebo průhledné víčko)**.
3. Do stejné vialky přidejte **5 µL Primer mixu (4x), v soupravě vialka č. 2 (modré ● nebo průhledné víčko)** a promíchejte opakovaným pipetováním.
4. Do stejné vialky přidejte **5 µL Enzyme mixu (4x), v soupravě vialka č. 3 (černé ● nebo průhledné víčko)**, a promíchejte opakovaným pipetováním, dokud není směs homogenní (můžete také použít vortex a krátce stočit).
5. **Volitelné:** pokud nepřidáváte kontrolu izolace RNA do vzorku před RNA izolací, **přidejte 0.1 µL z vialky Isolation control, v soupravě vialka č. 5 (fialové víčko ●)**, a promíchejte opakovaným pipetováním (pipeta by měla být pro míchání nastavena minimálně na ½ objemu míchaného roztoku) nebo s použitím vortexu.



6. Přeneste **15 µL směsi (RT-PCR master mix)** do 96-jamkové destičky nebo do mikrozkumavek (dle typu použitého PCR cyklu). Pokud nemůžete hned pokračovat s přidáním vzorků a následným RT-PCR, tak destičky/mikrozkumavky přikryjte víčkem (podrobnosti ke stabilitě jednotlivých složek soupravy a RT-PCR mixu viz kapitola 4.5).

Pro automatizovanou přípravu destičky s RT-PCR mixem a přidání vzorků je potřeba mrtvý objem. Celkový objem reakce i objem vzorků je proto možné o 10 % zmenšit oproti hodnotám uvedeným v kapitolách 5.5, 5.6 a 5.7 bez ovlivnění citlivosti detekce.

**Tabulka 9: Příprava RT-PCR master mixu**

Složky soupravy	Č. a barva víčka	µL na 1 reakci	µL na 100 reakcí
Enhancer mix (4x)	1 <sup>[1]</sup>	5	500
Primer mix (4x)	2 <sup>[1]</sup>	5	500
Enzyme mix (4x)	3 <sup>[1]</sup>	5	500
Isolation control (volitelné) <sup>[2]</sup>	5	0.1	10
Celkový objem RT-PCR master mix		15	1500

**[1]** Číslování vialek odpovídá pořadí přidávání jednotlivých složek, je důležité toto pořadí zachovat. **[2]** Objem Isolation control je zanedbán; do RT-PCR master mixu se přidává pouze v případě, že nebyla přidána při izolaci RNA (bližší informace viz kapitola 5.5).

## Alikvotování roztoků pro přípravu RT-PCR master mixu

Počty a objemy alikvotů jednotlivých složek této soupravy pro 1000 testů (1000rxns) jsou shrnuty v **Tabulce 8**. Pokud nechcete použít celou soupravu najednou, je vhodné si po prvním rozmrazení připravit jednorázové alikvoty. Jsou dva možné způsoby přípravy jednorázových alikvotů pro analýzu 96 vzorků (např. s využitím pipetovací stanice Agilent Bravo a soupravy DB-1206):

1. **V případě možnosti uchování alikvotů při teplotě  $\leq -70$  °C:** smíchejte veškerý obsah Enhancer mix (4x), Primer mix (4x) a Enzyme mix (4x). Dodržte toto pořadí a vždy promíchejte před přidáním Enzyme mixu. Poté znovu důkladně promíchejte a rozdělte do 10 alikvotů po 1,53 mL. Výsledkem bude 10 vialek s RT-PCR master mixem. Takto připravený RT-PCR master mix musí být co nejdříve zamrazen a uchováván při teplotě -70 °C nebo nižší. Po rozmrazení mix použijte co nejdříve, ideálně do 30 minut, avšak na pokojové teplotě je stabilní až 2 hodiny.
2. **V případě, že nemáte možnost uchovávat alikvoty při teplotě  $\leq -70$  °C,** připravte od každého z roztoků Enhancer mix (4x), Primer mix (4x) a Enzyme mix (4x) 10 alikvotů po 510 µL. Tyto alikvoty uchovejte při teplotě  $\leq -18$  °C. Pro přípravu RT-PCR master mixu pro analýzu 96 izolací poté smíchejte vždy po jednom alikvotu od každé komponenty a vzniklý mix použijte celý. Po rozmrazení a před smícháním jsou jednotlivé komponenty RT-PCR master mixu stabilní při pokojové teplotě po dobu 4 hodin.

## Alikvotování pozitivní kontroly

Z dodaných vialek si připravte z každé pět jednorázových alikvotů pozitivní kontroly, každý s objemem 150 µL. Tyto alikvoty mohou být uchovány podle potřeby optimálně při teplotě  $\leq -70$  °C, ale lze je skladovat i při teplotě  $\leq -18$  °C.



## Alikvotování izolační kontroly

Z dodaných vialek si připravte z každé pět jednorázových alikvotů izolační kontroly, každý s objemem 150 µL. Tyto alikvoty mohou být uchovány podle potřeby optimálně při teplotě -70 °C nebo nižší, ale lze je skladovat i při teplotě ≤ -18 °C.

Podrobnosti ke stabilitě a skladování jsou uvedeny v kapitole 4.5.

## 5.7 Přidání vzorku do RT-PCR reakce

**Přidejte 5 µL vzorku do jamek/mikrozkumavek**, které obsahují 15 µL RT-PCR master mixu. Po přidání vzorků do 96-jamkové destičky ji zalepte adhezivní optickou fólií a spusťte RT-PCR reakci (do 60 minut od přidání vzorků), jak je popsáno v kapitole 5.8.



**Každá destička musí obsahovat alespoň jednu pozitivní a jednu negativní kontrolu.** Součástí soupravy jsou nicméně dvě pozitivní kontroly (Positive control A a Positive control B, vialky č. 4A a 4B) a je doporučeno používat pro každou destičku obě tyto kontroly. V případě pozitivní kontroly přidejte místo vzorku **5 µL Positive control z vialky č. 4A nebo 4B (červené víčko ●)**. V případě negativní kontroly přidejte místo vzorku buď **5 µL RNA izolované ze známého negativního vzorku** nebo **5 µL elučního pufru** ze soupravy pro izolaci RNA nebo **5 µL ultračisté / PCR grade vody** (viz kapitola 5.3). Celkový objem reakce po přidání vzorku nebo kontrol je 20 µL.

Pro automatizovanou přípravu destičky s RT-PCR mixem a přidání vzorků je potřeba mrtvý objem. Celkový objem reakce i objem vzorků je proto možné o 10 % zmenšit oproti hodnotám uvedeným v kapitolách 5.5, 5.6 a 5.7 bez ovlivnění citlivosti detekce.

## 5.8 Protokol RT-PCR

Zde popsaný RT-PCR protokol k této soupravě byl validován na přístrojích **BioRad CFX96™** a **BioRad CFX Opus 96**, jejichž nastavení je identické. Lze jej použít také s jinými přístroji, které jsou schopné současné detekce v kanálech FAM, HEX, Texas Red (TEX), Cy5 a Cy5.5, je však na uživateli, aby provedl správné nastavení přístroje a ověřil fungování soupravy s využitím vhodných kontrol. Návod pro nastavení RT-PCR protokolu a detekce v příslušných kanálech naleznete v uživatelské příručce příslušného přístroje.

### 5.8.1 Nastavení přístrojů BioRad CFX96™ a BioRad CFX Opus 96

Pro detekci v pěti kanálech použijte výchozí nastavení přístrojů a nastavení filtrů dle **Tabulky 10**.

**Tabulka 10: Nastavení filtrů pro RT-PCR detekci na přístrojích BioRad**

Fluorophores	Excitation (nm)	Detection (nm)
FAM	450-490	515-530
HEX	515-535	560-580
Texas Red (TEX)*	560-590	610-650
Cy5	620-650	675-690
Cy5-5 (Cy5.5)*	672-684	705-730

\* V závorce je uvedena zkratka fluoroforu tak, jak je uváděna zde v textu, před závorkou pak název fluoroforu tak, jak je popsán v CFX Maestro software.

Program se skládá ze 4 kroků:

1. Reverzní transkripce virové RNA (RT step)
2. Aktivace Taq polymerázy (Denature)
3. PCR amplifikace (45 cyklů; Cycling)



#### 4. Ochlazení destičky (Cooling)

Nastavení cílové teploty a načasování každého kroku je uvedeno v **Tabulce 11**.

Objem vzorku „sample volume“ nastavte na 20 µL.

**Tabulka 11: Protokol pro RT-PCR detekci na přístrojích BioRad**

Variable	RT step	Denature	Cycling			Cooling
Cycles	1	1	45			1
Temperature (°C)	50	95	95	60	72	40
Hold time (hh:mm:ss)	00:10:00	00:02:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Plate read	NO	NO	NO	YES	NO	NO

Přibližná délka tohoto protokolu na přístrojích BioRad je 1 hod a 16 minut.

## 5.9 Analýza dat

### 5.9.1 Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu (Ct)

Provedte analýzu dat dle návodu k obsluze vašeho RT-PCR přístroje. Pro zobrazení fluorescence doporučujeme používat logaritmické zobrazení a doporučujeme používat barevnou kompenzaci mezi kanály FAM a HEX, pokud ji váš stroj nabízí. Nižší uvádíme doporučené hodnoty thresholdů (prahů fluorescence) pro vybrané přístroje, avšak v případě potřeby jejich hodnotu upravte tak, aby thresholdy při logaritmickém zobrazení protínaly křivky v jejich lineární části (neplatí pro lineárně zobrazené křivky), a zároveň aby byl threshold vždy nad pozadím u všech negativních vzorků. Úprava thresholdů může být vyžadována buď vyšší autofluorescencí vzorků (zejména slin), a tím pádem vyšším pozadím, nebo rozdíly mezi jednotlivými přístroji (byť od stejného výrobce).

Pro BioRad CFX96™ a BioRad CFX Opus 96 doporučujeme použít výchozí nastavení pro snímání kanálů FAM, HEX, Texas Red (TEX), Cy5 a Cy5-5 (Cy5.5). Pro určení hodnot Ct použijte výchozí metodu Single Threshold mode\* s **manuálně zvolenými thresholdy: 200 RFU pro FAM i HEX a 100 RFU pro TEX, Cy5 a Cy5.5**. Protože biologické vzorky mohou v PCR autofluoreskovat, tak může být nutné manuálně zvolené thresholdy navýšit oproti výše uvedeným hodnotám. **Všechny hodnoty Ct uváděné v kapitolách 5.9.2 a 5.9.3 odpovídají vyhodnocení s výše uvedenými thresholdy.**

Naměřená data je v každém případě nutné vizuálně zkontrolovat, protože v důsledku použití prahové fluorescence pro výpočet Ct může dojít k nesprávnému vyhodnocení křivek. Metoda Single Threshold mode může například v důsledku neobvyklého tvaru křivky vyhodnotit negativní vzorek jako pozitivní – např. při skokovém nárůstu fluorescence v důsledku bubliny v reakční směsi atd. Všechny křivky se strmým a trvajícím nárůstem fluorescence musí být vyhodnoceny jako pozitivní (standardní vzhled křivek viz kapitola 5.9.4), zatímco ostatní křivky musí být vyhodnoceny jako negativní (vzhled problematických křivek je popsán v kapitole 5.9.3 pod **Tabulkou 12**). U strojů BioRad pozorujeme cca 2% přesvit fluorescence z kanálu FAM do HEX, v případě vysoké fluorescence ve FAM (fluorescence FAM může dosáhnout hodnot RFU i přes 10 000) tak může být chybně vyhodnocen jako pozitivní kanál HEX, i když by se jednalo pouze o přesvit. Doporučujeme proto pro jamky, ve kterých je fluorescence ve FAM vyšší než 5 000 RFU, použít threshold pro HEX alespoň 300 RFU (namísto 200 RFU).

Získané hodnoty Ct se budou lišit v závislosti na použitém RT-PCR přístroji, metodě vyhodnocení a nastavení thresholdů. Hodnoty Ct tak nelze použít pro srovnání vzorků, pokud byly analyzovány v jiném běhu. Pro ilustraci, pozadí u strojů BioRad je typicky výrazně nižší než výše doporučené prahové fluorescence, a pokud nastavíte tento práh těsně k hodnotě pozadí, pak můžete dostat hodnoty Ct i o 3 až 5 cyklů nižší než s doporučenými prahy. Nevýhodou takto nízko nastavených prahů je náchylnost k falešně pozitivní interpretaci jamek s autofluoreskujícími vzorky nebo



při přesvitu z jiného kanálu. Naopak, pokud nastavíte prahovou fluorescenci vysoko, tak můžete získat hodnoty Ct i o 3 až 5 cyklů vyšší a s minimálním rizikem falešně pozitivní interpretace, avšak můžete minout slabě pozitivní vzorky, které nedosáhnou této prahové fluorescence (maximální fluorescence vzorků se v jednotlivých kanálech pohybuje typicky mezi 1 000 a 10 000 RFU jednotek). Proto doporučujeme výše uvedené hodnoty jako prahové fluorescence. Hodnoty Ct ale nejsou přesně porovnatelné ani mezi různými měřeními na stejném typu přístroje a se stejně zvoleným thresholdem: z naší zkušenosti se naměřené fluorescence mezi různými běhy nebo různými přístroji BioRad liší až dvojnásobně.

Veškeré očekávané hodnoty Ct uvedené níže u vyhodnocení kontrol a v **Tabulce 12** předpokládají dodržení návodu (např. přidané objemy komponent) a výše popsaného nastavení BioRad přístrojů (metoda Single Threshold mode s manuálně nastavenými thresholdy). V případě použití jiného nastavení či jiné metody je pro přesnou interpretaci podle **Tabulky 12** nutné naměřené hodnoty Ct posunout o rozdíl mezi vámi určenou hodnotou Ct pozitivní kontroly a referenční hodnotou Ct = 28 (pro kanál FAM, HEX, TEX i Cy5.5). Například, pokud vámi určená hodnota Ct pro pozitivní kontrolu bude 24, tak pro aplikaci **Tabulky 12** buď přičtete 4 cykly k hodnotám Ct klinických vzorků, anebo 4 cykly odečtete od prahových Ct v **Tabulce 12**.

*\* Metoda je také nazývána Threshold Crossing, Cycle Threshold nebo Fit Points, kde hodnota Ct odpovídá cyklu, kde fluorescence vzroste nad úroveň pozadí a překračuje předem stanovenou prahovou hodnotu.*

## 5.9.2 Vyhodnocení kontrol

U **pozitivní kontroly** musí k amplifikaci dojít ve čtyřech kanálech: virových genů ve FAM, HEX, TEX a Cy5.5 (v závislosti na použitém plastiku, cyklu a objemu vzorku jsou pro tyto kanály očekávané Ct hodnoty v rozmezí 26-33 cyklů). Pokud nedojde k amplifikaci v některém z těchto kanálů (tzn. že v některém z těchto kanálů bude  $C_t > 35$ ), PCR reakce neproběhla správně a výsledky z takové analýzy nejsou platné a musí být zopakovány. Pro určení hodnot  $C_t$  použijte výše popsané nastavení thresholdů v metodě Single Threshold mode. Amplifikace izolační kontroly v Cy5 by měla vést k  $C_t < 35$  cyklů, avšak pro vyhodnocení pozitivní kontroly to není nutné (signál kontroly v Cy5 bude měřitelný pouze pokud pozitivní kontrola prošla izolací, pokud přidáváte 5  $\mu$ L pozitivní kontroly přímo do RT-PCR reakce a nepřidáte zvlášť také izolační kontrolu, tak Cy5 bude negativní).

U **negativní kontroly** musí dojít k amplifikaci izolační kontroly v kanálu Cy5 (<40 cyklů), zatímco v ostatních kanálech nesmí být žádná amplifikace. Měřitelná amplifikace v kanálech FAM, HEX, TEX nebo Cy5.5 ukazuje na možnou kontaminaci reagensy templátem, což může způsobit falešně pozitivní výsledky. V takovém případě je nutné otestovat větší počet negativních kontrol (signál kontroly v Cy5 bude měřitelný pouze pokud negativní kontrola prošla izolací, pokud přidáváte 5  $\mu$ L negativní kontroly přímo do RT-PCR reakce, a nepřidáte zvlášť také izolační kontrolu, tak Cy5 bude negativní).



**Izolační kontrola** musí být vyhodnocena u každého vzorku, nicméně u pozitivních vzorků může být amplifikace izolační kontroly negativně ovlivněna amplifikací virových genů a Ct hodnoty v kanále Cy5 mohou být výrazně vyšší než u negativní kontroly, případně pod thresholdem. Pokud test vyhodnocujete pouze kvalitativně, **pozitivní vzorky jsou považovány za pozitivní i v případě, že nevyjde izolační kontrola**. U vzorků, které jsou v kanálech FAM, HEX, TEX a Cy5.5 negativní anebo s  $C_t > 37$ , je nutné zkontrolovat amplifikaci kontroly v Cy5. V případě, že je  $C_t$  v Cy5 u takového vzorku > 40. cyklus nebo je signál nedetekovatelný, lze usuzovat na nízkou účinnost izolace RNA nebo na inhibici RT-PCR reakce, a je nutné izolaci RNA z daného vzorku zopakovat.

## 5.9.3 Interpretace výsledků měřených vzorků

Stanovte hodnoty prahového detekčního cyklu ( $C_t$ ) v každém kanálu a výsledky interpretujte dle **Tabulky 12** a dle výsledků vyhodnocení pozitivní kontroly. V případě, že používáte doporučený





postup pro určení Ct a vámi získané hodnoty Ct pro pozitivní kontrolu odpovídají mezím uvedeným v předchozím oddíle (tj. Ct pro kanál FAM, HEX, TEX i Cy5.5 jsou mezi 26. a 33. cyklem), můžete interpretovat naměřená Ct dle této tabulky bez dalších přepočtů Ct. V opačném případě je nutno stanovené Ct před interpretací dle **Tabulky 12** přepočítat, jak je uvedeno výše v kapitole 5.9.1.

### Tabulka 12: Interpretace výsledků

**Symbol „-“ značí Ct > 40 cyklů nebo nedetekovatelný signál; symbol „+“ značí Ct ≤ 40 cyklů.**

Ve FAM je detekován SARS-CoV-2, v HEX Influenza A, v TEX Influenza B, v Cy5.5 RSV a v Cy5 izolační kontrola. Hodnoty Ct uvedené v této tabulce předpokládají analýzu na strojích BioRad za vyhodnocení dle výše popsaného postupu a nastavení thresholdů (viz kapitoly 5.8.1 a 5.9.1).

FAM <sup>[7,8]</sup>	HEX <sup>[6,7,8]</sup>	TEX <sup>[7,8]</sup>	Cy5.5 <sup>[7,8]</sup>	Cy5	Interpretace
Ct < 37	-	-	-	+ <sup>[1]</sup> / - <sup>[2]</sup>	<b>SARS-CoV-2 pozitivní</b> <sup>[5]</sup>
-	Ct < 37	-	-	+ <sup>[1]</sup> / - <sup>[2]</sup>	<b>Influenza A pozitivní</b> <sup>[5]</sup>
-	-	Ct < 37	-	+ <sup>[1]</sup> / - <sup>[2]</sup>	<b>Influenza B pozitivní</b> <sup>[5]</sup>
-	-	-	Ct < 37	+ <sup>[1]</sup> / - <sup>[2]</sup>	<b>RSV pozitivní</b> <sup>[5]</sup>
Ct 37–40 <sup>[3]</sup>	-	-	-	+ <sup>[1]</sup>	<b>Slabě pozitivní pro SARS-CoV-2, opakovat pro potvrzení</b> <sup>[5]</sup>
-	Ct 37–40 <sup>[3]</sup>	-	-	+ <sup>[1]</sup>	<b>Slabě pozitivní pro Influenza A, opakovat pro potvrzení</b> <sup>[5]</sup>
-	-	Ct 37–40 <sup>[3]</sup>	-	+ <sup>[1]</sup>	<b>Slabě pozitivní pro Influenza B, opakovat pro potvrzení</b> <sup>[5]</sup>
-	-	-	Ct 37–40 <sup>[3]</sup>	+ <sup>[1]</sup>	<b>Slabě pozitivní pro RSV, opakovat pro potvrzení</b> <sup>[5]</sup>
Ct 37–40 <sup>[3]</sup>	-	-	-	-	<b>Slabě pozitivní pro SARS-CoV-2, inhibice RT-PCR, opakovat pro potvrzení</b> <sup>[4,5]</sup>
-	Ct 37–40 <sup>[3]</sup>	-	-	-	<b>Slabě pozitivní pro Influenza A, inhibice RT-PCR, opakovat pro potvrzení</b> <sup>[4,5]</sup>
-	-	Ct 37–40 <sup>[3]</sup>	-	-	<b>Slabě pozitivní pro Influenza B, inhibice RT-PCR, opakovat pro potvrzení</b> <sup>[4,5]</sup>
-	-	-	Ct 37–40 <sup>[3]</sup>	-	<b>Slabě pozitivní pro RSV, inhibice RT-PCR, opakovat pro potvrzení</b> <sup>[4,5]</sup>
Ct < 40	Ct < 40	-	-	+ <sup>[1]</sup> / - <sup>[2]</sup>	<b>Příklad koinfekce dvou virů (SARS-CoV-2 a Influenza A)</b> <sup>[5,6,9]</sup>
Ct < 40	Ct < 40	-	Ct < 40	+ <sup>[1]</sup> / - <sup>[2]</sup>	<b>Příklad koinfekce více virů (SARS-CoV-2, Influenza A a RSV)</b> <sup>[5,6,9]</sup>
-	-	-	-	+ <sup>[1]</sup>	<b>Nedetekovatelné (negativní) pro vše (SARS-CoV-2, Influenza A a B a RSV)</b> <sup>[5]</sup>
-	-	-	-	-	<b>Nespolehlivý výsledek: inhibice RT-PCR, zopakovat nebo provést izolaci RNA.</b>

**[1]** Pokud byla do vzorku přidána kontrola izolace RNA před izolací RNA v množství podle pokynů a byl dodržen standardní protokol izolace (tj. pro RT-PCR bylo použito přibližně 1/10 eluce, např. 5 z 50 µL), hodnota Ct pro Cy5 by měla být kolem 35. cyklu nebo nižší.

**[2]** Vysoké koncentrace virové RNA detekované v kterémkoliv kanále mohou způsobit zhoršení amplifikace izolační kontroly, což se projeví snížením signálu v kanálu Cy5 či jeho úplnou absencí (podrobnosti viz **Obrázek 3**). Absence signálu v Cy5 nemění interpretaci pozitivních signálů ve FAM, HEX, TEX nebo Cy5.5.

**[3]** Jakoukoliv amplifikaci ve FAM, HEX, TEX nebo Cy5.5 s Ct < 40. cyklus lze považovat za pozitivní výsledek, avšak pokud je Ct vyšší než 37. cyklus, pak je nutné pro potvrzení test zopakovat (se stejným vzorkem pro



vyloučení náhodné kontaminace anebo s novým odběrem pro potvrzení klinické relevance). Opakovaně pozitivní výsledek v daném kanále je považován za pozitivitu na daný virus.

**[4]** V případě, že je Ct v kanálech FAM, HEX, TEX nebo Cy5.5 mezi 37. až 40. cyklem a zároveň je signál v Cy5 kanále vyšší než 40. cyklus nebo nedetekovatelný, pak je nutné test opakovat, protože pravděpodobně došlo k inhibici RT-PCR nebo ke snížení účinnosti izolace RNA. Opakovaně pozitivní výsledek v daném kanále je považován za pozitivitu na daný virus.

**[5]** Negativita v jakémkoliv kanálu nesmí být použita jako jediné vodítko pro vyloučení infekce daným virem. Zejména pokud je nějaký z jiných kanálů pozitivní, může docházet k oslabení citlivosti detekce v ostatních kanálech. Přestože tato souprava dokáže detekovat koinfekce dvěma nebo více viry najednou, tak při silném signálu ve FAM (~20. cyklus) bylo pozorováno snížení účinnosti amplifikace v ostatních kanálech, Influenza A a Influenza B byly i tak detekovány v koncentracích odpovídajících 3x LOD, ale RSV bylo detekováno až v koncentracích 10x až 50x LOD. Naproti tomu v případě silného signálu v kanálech HEX, TEX nebo Cy5.5 (~25. cyklus) nebyla detekce SARS-CoV-2 negativně ovlivněna ani při 3x LOD, a slabá koinfekce SARS-CoV-2 by tak měla být spolehlivě detekována.

**[6]** Pro interpretaci koinfekce Influenza A a SARS-CoV-2 je nutné vyloučit přesvit z FAM do HEX (vyloučit křivky s maximálním RFU v HEX do 300 v případě, že ve FAM je fluorescence více jak 5000 RFU).

**[7]** V jakémkoliv kanále může docházet k pozvolnému nárůstu signálu i v negativních vzorcích, nicméně typicky s Ct > 30 a s koncovou fluorescencí maximálně 100-200 RFU. Může být nutné zvýšit threshold příslušného kanálu pro vyloučení těchto křivek. Tyto „neamplifikační“ křivky je možné spolehlivě odhalit vizuální kontrolou jejich tvaru: mají zcela jiný tvar oproti standardním amplifikačním křivkám, kdy jim chybí postupný exponenciální nárůst z nízkého pozadí a koncové plató.

**[8]** V jakémkoliv kanále může dojít k autofluorescenci vzorku projevující se vysokou fluorescencí od brzkých cyklů PCR protokolu, typicky s Ct < 10 a s koncovou fluorescencí v řádu stovek RFU. Nejčastěji se autofluorescence vyskytují v kanálech TEX a Cy5.5.

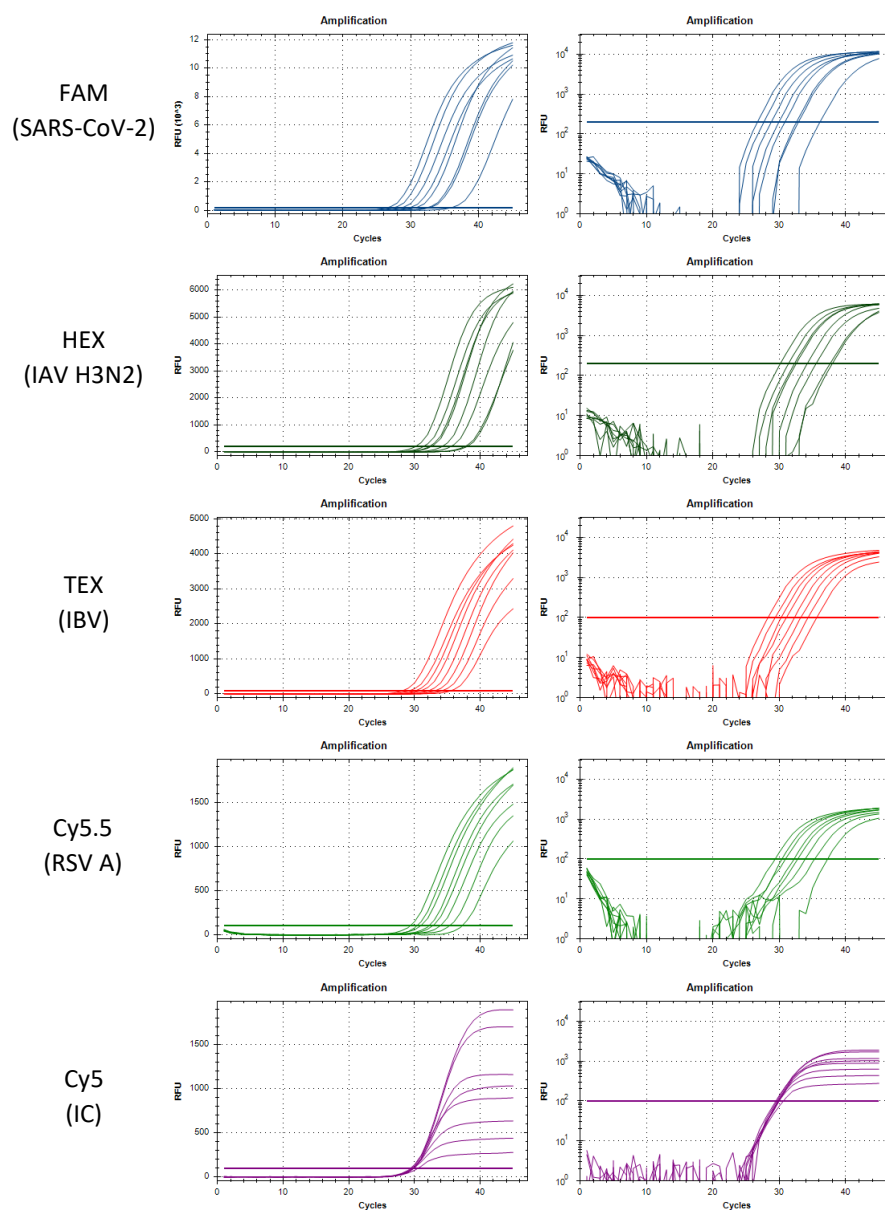
**[9]** V případě, že je Ct v jakémkoliv z kanálů FAM, HEX, TEX nebo Cy5.5 mezi 37. až 40. cyklem, pak je nutné pro potvrzení positivity v daném kanále test zopakovat (pokud je test zároveň pozitivní v jiném kanále s Ct < 37, pak pozitivitu v tomto kanále není nutné potvrzovat opakováním; test opakujte se stejným vzorkem pro vyloučení náhodné kontaminace anebo s novým odběrem pro potvrzení klinické relevance). Opakovaně pozitivní výsledek (Ct ≤ 40) v daném kanále je považován za pozitivitu na daný virus.





### 5.9.4 Typické výsledky

Na **Obrázku 3** jsou vyobrazena ilustrativní data naměřená s ředící řadou virové RNA se soupravou DB-1250.



**Obrázek 3: Detekce ředící řady virových RNA v množství od 1 000 do 5 kopií v jamce na přístroji BioRad CFX Opus 96**

První dvojice grafů ukazuje amplifikaci signálu v kanálu FAM (SARS-CoV-2), druhá v HEX (Influenza A H3N2), třetí v TEX (Influenza B), čtvrtá v Cy5.5 (RSV A) a pátá v Cy5 (izolační kontrola). Grafy vlevo ukazují fluorescenci v lineárním měřítku, zatímco grafy vpravo ukazují fluorescenci v logaritmickém měřítku. Koncové fluorescence (RFU) i tvary křivek se mohou lišit mezi jednotlivými kanály/esejemi. Amplifikace v kanále Cy5 je snížena při vysokých titrech virové RNA (křivky se snižující se maximální fluorescencí odpovídají jamkám se vzrůstajícím množstvím virových RNA). **Použitý materiál:** FrameStar 96 Well Semi-Skirted PCR plate (4ti-0951, white wells) a LightCycler 480 Sealing Foil (04729757001).



## 6 Právní upozornění

V plném rozsahu povoleném zákony vaší jurisdikce, je DIANA Biotechnologies, a.s., zbavena odpovědnosti za jakékoli přímé nebo nepřímé škody spojené nebo vzniklé v souvislosti s tímto dokumentem a jeho použitím, jakož i za jakékoli přímé a nepřímé škody spojené nebo vzniklé v souvislosti s RT-PCR Respiratory panel 1: SARS-CoV-2/Flu/RSV kitem a jeho použitím.

## 7 Seznam kompatibilních prostředků

- REF** DB-1206 Automated RNA Isolation Kit
- REF** DB-1214 Agilent Bravo Installation Package for Automated RNA Isolation Kit
- REF** DB-1225 Saliva Collection Set 1.4IM
- REF** DB-1230 Saliva Collection Set 1.4IF



## 8 Jednostránkový souhrnný protokol

### 8.1 Složky soupravy

Složky soupravy	Objem (μL)		Podmínky skladování	Popis a barva víčka
	100rxns	1000rxns		
Enhancer mix (4x)	500	5000	≤ -18 °C	1
Primer mix (4x)	500	5000	≤ -18 °C	2
Enzyme mix (4x)	500	5000	≤ -18 °C	3
Positive control A	150	2x 750	≤ -18 °C	4A
Positive control B	150	2x 750	≤ -18 °C	4B
Isolation control	150	2x 750	≤ -18 °C	5

### 8.2 Příprava RT-PCR

- Po rozmrazení všechny složky promíchejte, každou vialku před otevřením stočte.
- V následujícím pořadí smíchejte: 5 μL Enhancer mixu (vialka č. 1), 5 μL Primer mixu (vialka č. 2) a 5 μL Enzyme mixu (vialka č. 3). Promíchejte po přidání každé složky.
- Přeneste 15 μL tohoto RT-PCR master mixu do 96-jamkové destičky, přidejte 5 μL vzorku (izolované RNA), zalepte destičku optickou fólií a co nejdříve spusťte RT-PCR reakci.
- Pro pozitivní a negativní kontrolu přidejte místo vzorku 5 μL pozitivní (vialka č. 4A nebo 4B) nebo negativní kontroly.

Tabulka shrnující objemy jednotlivých složek RT-PCR master mixu potřebné pro 1 a 100 reakcí:

Složky soupravy	Popis	μL na 1 reakci	μL na 100 reakcí
Enhancer mix (4x)	1	5	500
Primer mix (4x)	2	5	500
Enzyme mix (4x)	3	5	500
Isolation control (volitelné)	5	0.1	10
Celkový objem RT-PCR master mixu		15	1500

### 8.3 Protokol RT-PCR














Tabulka sumarizující nastavení RT-PCR cyklu:

Variable	RT step	Denature	Cycling			Cooling
Cycles	1	1	45			1
Temperature (°C)	50	95	95	60	72	40
Hold time hh:mm:ss	00:10:00	00:02:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Plate read	NO	NO	NO	YES	NO	NO

Snímání musí být nastaveno pro současnou detekci kanálů FAM, HEX, TEX, Cy5 a Cy5.5. Postup pro nastavení detekce naleznete v kapitole 5.8 a v návodu příslušného přístroje.



## 9 Použité grafické symboly

	Manufacturer / Výrobce
	Caution / Pozor (výstraha)
	Lot Number / Kód dávky
	Operator's manual, operating instructions / Čtěte návod k použití
	Catalogue Number / Katalogové číslo
	Component volume / Objem komponenty
	Package contains / Balení obsahuje
	Positive control / Pozitivní kontrola
	Upper limit of temperature / Horní mez teploty* (*pro X odpovídající konkrétní teplotě)
	Use by date / Použit do data
	Amount (No. of reactions) / Obsah postačuje pro <n> testů** (**pro n testů dle varianty kitu)
	CE marking / Prostředek označený CE značkou
	Diagnostic medical device in vitro / Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>

